

Dissociation expérimentale entre la morphogenèse et la différenciation de l'ébauche neurale chez les Amphibiens

par

J. GALLERA

Laboratoire d'Embryologie expérimentale, Institut d'Anatomie,
Université de Genève.

Avec 6 figures dans le texte

INTRODUCTION

L'analyse des anomalies spontanées et les recherches expérimentales ont révélé que la cytodifférenciation des diverses ébauches embryonnaires n'est pas simplement un effet de leur morphogenèse préalable. Cependant, le blocage des processus morphogénétiques propres à une ébauche embryonnaire peut entraîner une modification profonde de sa différenciation. Par exemple, les expériences de TAKAYA (1953) et de HOESSELS (1957) ont montré que la plaque préchordale présomptive, prélevée avant son invagination, enrobée dans l'ectoblaste provenant d'une autre gastrula, et cultivée en solution de Holtfreter évolue en chorde et en tissu musculaire. TÖNDURY (1948) et DALCQ et LALLIER (1948) ont observé que le matériel chordo-mésoblastique transplanté peut se transformer en tissu neural si l'on inhibe la cinématique propre à ce matériel. Cependant, NIU et TWITTY (1953), en cultivant de jeunes cellules

¹ Travail subventionné par le Fonds national suisse de la recherche scientifique.

ectoblastiques dissociées et dispersées dans une solution spéciale, contenant des substances inductrices produites par le chordo-mésoblaste, ont constaté la différenciation normale de ces cellules en neurones et éléments pigmentaires. Or, dans ces conditions expérimentales, aucun processus morphogénétique n'a pas pu avoir lieu. Ces quelques exemples témoignent déjà que les rapports entre la morphogenèse et l'histogenèse sont complexes et que leurs modalités diffèrent selon les ébauches.

Les expériences de HOLTFRETER (1945) ont abordé le problème de ces rapports d'une manière bien plus directe. Cet auteur incluait des gastrulas avancées et de jeunes neurulas dans une solution tiède d'agar à 3%. Après la gélification, il isolait l'embryon dans un petit bloc d'agar et celui-ci était cultivé en solution saline durant 7 à 10 jours. La croissance de ces embryons, en tout cas leur allongement, était complètement arrêté. Les processus respiratoires, par contre, ne semblaient guère gênés. Quoique la forme générale de l'embryon se soit maintenue telle qu'elle était à l'inclusion, le développement continuait et la différenciation histologique des diverses ébauches, en particulier du système nerveux, se poursuivait plus ou moins normalement. Révétons que la croissance de l'embryon, quant à l'augmentation de son volume, est à ces stades du développement minime, sinon nulle, et que, dans les expériences de HOLTFRETER, les modifications de forme des ébauches embryonnaires ont pu au moins partiellement se réaliser aux dépens de la grande cavité archentérique. Les expériences de HOLTFRETER ne démontrent donc qu'une indépendance relative entre les processus histogénétiques et l'allongement du corps embryonnaire.

Dans les expériences analogues, que je vais relater dans ce travail, ce ne sont pas des germes entiers que j'inclus en agar, mais des parties déterminées de la plaque neurale. Ces fragments sont prélevés sur des embryons dont la plaque neurale est déjà bien visible grâce à la présence du liséré pigmenté ou, plus souvent, des bourrelets médullaires en relief. A ce stade l'induction neurale est plus ou moins achevée, de sorte qu'un fragment excisé de l'ébauche neurale et cultivé *in vitro* est déjà capable de poursuivre son développement normal. Dans mes expériences, non seulement la croissance, mais tous les changements de forme de la plaque neurale sont, soit complètement bloqués, soit fortement inhibés.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Toutes les expériences sont pratiquées sur des embryons de *Triturus alpestris*. Des régions déterminées de la plaque neurale sont excisées et, généralement, détachées de leur substratum. Dans quelques cas, des fragments de la plaque neurale sont prélevés avec la voûte archentérique sous-jacente. Dans la plupart des expériences, le secteur de la plaque neurale est découpé avec une bande de l'épiblaste latéro-ventral dont la largeur correspond à celle de l'ébauche neurale. Cet épiblaste est rabattu sous la plaque neurale et l'explantat est couvert pour quelques minutes d'une mince lame de mica, afin que l'épiblaste se soude à la face ventrale de l'ébauche neurale ou, éventuellement, de la voûte archentérique. Les explantats sont de trois types: les uns correspondent à la région acrencéphalique de la plaque neurale, les autres à l'ébauche cérébrale entière, le troisième type provient d'un segment à cheval sur les régions cérébrale et médullaire (voir fig. 1).

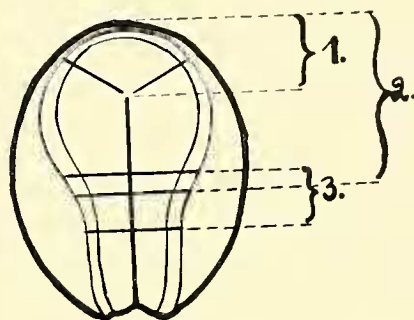


FIG. 1.

Trois types d'explantats. 1. région acrencéphalique; 2. plaque cérébrale entière; 3. segment de la plaque neurale découpé à cheval sur sa région cérébrale et médullaire.

L'agar, à raison de 1,25%, est dissout dans la solution de Holtfreter sans bicarbonate de sodium, l'ensemble est stérilisé par ébullition deux fois répétée et refroidi à 30-36° C. Une lame porte-objet est couverte d'une mince couche de gélose et après sa solidification une petite excavation est préparée dans l'agar à l'aide d'une tige en métal chauffée. L'explantat avec une petite quantité de liquide est transporté dans cette cavité. On aspire le liquide jusqu'au moment où son niveau affleure les bords de l'excavation, on verse par dessus deux gouttes d'agar liquide qui s'étale en une couche mince. Le fragment embryonnaire est encore entouré de la solution de Holtfreter. Il faut alors le retirer à l'aide d'une anse en platine et le déplacer de façon qu'il repose sur la couche gélifiée recouvert sur les autres faces par l'agar encore liquide. Après la

gélification, le tout constitue une masse homogène dans laquelle on délimite un petit bloc contenant l'explantat. Les explantats sont cultivés dans une solution de Holtfreter fraîche pendant dix à treize jours; ces carrelets sont alors fixés au Bouin. Afin de pouvoir enregistrer des éventuelles modifications de forme des explantats ou leur croissance, ils sont dessinés en conditions standards à la chambre claire après la préparation des blocs d'agar et avant leur fixation. Tout mon matériel est examiné sur des coupes sériées colorées à l'hémalun et au mélange d'éosine et d'orange.

Quoique dans les expériences de HOLTFRETER un léger choc thermique, dû à l'immersion des embryons entiers dans la solution d'agar encore tiède, ne semble guère leur nuire, j'ai voulu savoir si les explantats embryonnaires sont plus sensibles à une élévation brusque et momentanée de la température. Dans ce but, des explantats, préparés de la même façon que ceux destinés à être inclus en agar, sont immergés pour quelques secondes dans la solution de Holtfreter chauffée à 30-36° C; ensuite ils sont transportés dans la solution fraîche et élevés sur fond d'agar pendant dix à quatorze jours.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Avant d'aborder l'analyse des explantats neuraux enrobés en agar, il est nécessaire d'établir quelles sont les possibilités évolutives des explantats identiques, mais élevés dans des conditions normales de culture *in vitro*. Heureusement, les recherches systématiques de VON WOELLWARTH (1952), effectuées sur le même matériel, fournissent des renseignements précis à ce sujet. Les explantats cérébraux de cet auteur, prélevés avec de l'épiblaste céphalique sur de jeunes neurulas et cultivés *in vitro* dans la solution de Holtfreter diluée, assumaient la forme de petits ballons épiblastiques contenant le cerveau et des organes des sens plus ou moins bien développés. Les vésicules encéphaliques étaient toujours constituées, cependant le télencéphale ne manifestait, à quelques exceptions près, aucune tendance à se subdiviser en hémisphères. Conformément à cet indice de sous-induction, l'ébauche oculaire était représentée par un œil cyclope ou synophtalmo-cyclope, de

son côté la palcode olfactive impaire n'était que rarement dédoublée en partie. Les cellules ecto-mésenchymateuses et pigmentaires, dérivées de la crête neurale, étaient toujours abondantes. Rappelons encore que la différenciation des ébauches fournies par les explantats de von WOELLWARTH était plus ou moins retardée par rapport à celle des embryons témoins. La zone marginale et fibreuse de la paroi du tube neural était mince et peu développé; en revanche, les plaquettes vitellines étaient encore très nombreuses dans des ébauches encéphaliques âgées de dix à douze jours.

Mes explantats cérébraux soumis à un court choc thermique ont fourni des résultats rigoureusement comparables, ce qui prouve qu'il n'a pas été traumatisant. Deux de mes explantats de contrôle contenaient la plaque cérébrale et la voûte archentérique sous-jacente. Dans ces conditions, le processus de l'induction neurale a pu se parachever encore après le prélèvement des explantats et, en effet, leurs prestations sont meilleures que celles des explantats exclusivement neuro-épiblastiques. Dans ces deux cas, aussi bien le cerveau que les organes des sens se sont normalement développés et le substratum de la plaque neurale s'est différencié en chorde, en tissu musculaire et en mésenchyme. Les explantats de contrôle, prélevés sur la région cérébrale postérieure et médullaire antérieure de la plaque neurale, se sont développés conformément à leur origine. Leur différenciation cytologique est bonne, des ganglions, correspondant probablement à la dixième paire des nerfs crâniens, se sont formés. De l'ecto-mésenchyme et de nombreuses cellules pigmentaires sont toujours présents. La seule anomalie à noter est la forte dilatation hydropique des vésicules neurales, phénomène qui se produit fréquemment en pareil cas.

Un hasard heureux a complété d'une façon particulièrement démonstrative mes expériences de contrôle. Durant les premiers jours de culture, cinq de mes explantats enrobés dans l'agar se sont libérés, en profitant de la présence accidentelle d'une fente étroite dans la paroi du bloc d'agar. Tout d'abord une petite évagination pénétrait dans cette fente et l'explantat dans sa totalité s'est échappé par cet orifice étroit. Le même phénomène a été observé et provoqué volontairement par HOLTRETER, lequel excisait dans ses blocs d'agar, contenant des embryons entiers, des tunnels étroits. « L'écoulement » des embryons par ces canaux, beaucoup plus étroits que leur diamètre, prouve, comme HOLTRETER

l'a remarqué, que la pression du liquide contenu à l'intérieur du germe enrobé doit être élevée. Dans mes explantats, une certaine quantité de liquide s'accumulait entre la plaque neurale et l'épiblaste revêtant sa face ventrale. Mes explantats, libérés de leur gaine artificielle, se développaient comme ceux de contrôle, tout au plus la forme des structures neurales était un peu moins régulière.

Explantats neuraux enrobés dans l'agar.

Les premières expériences ont montré que si la face ventrale des fragments neurectoblastiques n'est pas recouverte d'épiblaste, ils se désintègrent dans la moitié des cas environ. J'ai donc modifié ma technique expérimentale, en prenant soin que la quantité d'épiblaste suffise à revêtir la face ventrale du fragment neurectoblastique excisé. Dans ces conditions, la mortalité ne s'élevait guère au-dessus d'un cinquième des cas.

Sur la figure 2, on voit des croquis des explantats cérébraux et encéphalo-médullaires exécutés immédiatement après leur mise en agar et avant leur fixation. On constate que les dimensions et la forme générale des explantats ne se sont guère modifiées. Notons cependant que l'on n'a pas tenu compte des variations d'épaisseur, d'ailleurs peu probables. Pendant les premières 24 heures, le dessin des bourrelets médullaires et du sillon médian s'estompe progressivement. Ces explantats sont, pourtant, bien vivants et leur évolution se poursuit. Le cinquième ou le sixième jour d'élevage des mélanophores, en général peu nombreux, apparaissent dans la plupart des cas. Plus tard on distingue l'ébauche oculaire dont la pigmentation est relativement peu marquée et discontinue. Ces ébauches sont situées aussi loin en avant que le territoire oculaire présomptif d'une jeune plaque neurale (JACOBSON, 1959), mais elles sont beaucoup plus larges que ce territoire.

Mentionnons enfin que dans quelques cas (un neuvième environ), où les explantats ont été enrobés défectueusement en agar, de sorte qu'une mince couche de la solution de Holtfreter les entourait encore, ils se sont arrondis et ils ont augmenté de volume. Leur développement ultérieur se rapproche beaucoup de celui de nos explantats de contrôle.

Les prestations individuelles de mes explantats sont rapportées sur le tableau ci-joint. Comme on l'y voit, l'ébauche neurale est

toujours formée, mais elle est réduite à une plaque largement étalée.

Dans quatre cas seulement sa partie antérieure s'est enroulée en constituant une vésicule encéphalique petite et atypique. A l'exception de deux cas, les explantats cérébraux ont fourni des

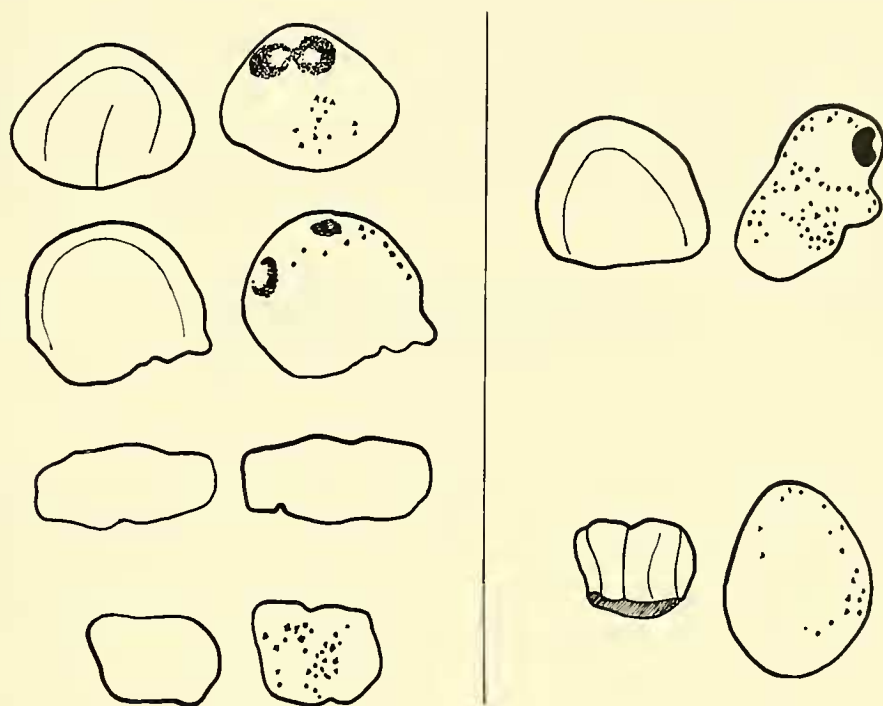


FIG. 2.

Explantats dessinés à la chambre claire immédiatement après leur préparation et avant leur fixation.

A gauche de la ligne verticale: explantats enrobés dans l'agar;
à droite: explantats de contrôle.

ébauches oculaires. Elles sont cyclopes ou synophtalmo-cyclopes ou enfin, si la plaque neurale avait été excisée avec son substratum, les deux yeux sont généralement constitués. Les cupules optiques sont toujours aplaties et souvent leurs parois sont accolées. Dans de nombreux cas, le feuillet sensoriel de la rétine est plissé irrégulièrement. Les ébauches oculaires sont accompagnées d'un ou de deux cristallins, dans un cas il y en a même trois. La formation des placodes olfactives est beaucoup plus rare et elles sont en général très peu différenciées. La présence des vésicules auditives, le plus souvent paires, est plus fréquente. Dans cinq cas, elles ont même donné naissance aux ganglions stato-acoustiques. Les éléments de la crête neurale, laquelle se forme toujours, se sont

différenciés en ecto-mésenchyme et plus rarement en cellules pigmentaires.

TABLEAU

Prestations des explantats enrobés en agar

numéro	explantat	Les explantats ont formé:										autres ébauches
		plaque neurale	placode olfactive	œil	cristallin	otocyste	ganglions	cellules pigmentaires	chorde	muscles	masse endo-blastique	
1*	plaque acrencéphalique	+		1	2							
2*		+	1	1	2							
3*	segment cérébromédullaire	+										
4*		+										
5*		+		1	1							
6*		+		1	1							
7		+		1	2				+			
8		+		1	1	2			+			
9		+		1	3	2						
10		+	1	1	1	2			+			
11		+	1	1	2	2	+		+			
12		+		1	2	2	+		+			
13		+		1	2				+			
14		+	2	1	2				+			vésicule acrencéphalique
15	même + substratum	+		1	2	1			+	+	+	
16		+	2	2	2	1			+	+	+	vésicule acrencéphalique
17		+	2	2	2	2	+	+	+	+	+	vésicule acrencéphalique
18		+	2	2	2	2		+	+	+	+	cartilages
19		+	2	2	2	2	+	+	+	+	+	acrencéphale, dents
20*	plaque cérébrale entière	+										
21*		+							+			
22*		+										
23*		+				1?			+			
24		+							+			
25		+							+			
26		+							+			
27		+							+			
28		+							+			
29		+				1	+		+			
30		+				2?			+			
31	même + substratum	+							+	+	+	
32		+							+	+	+	

Les explantats non couverts d'épiblaste sont signalés par un astérisque

Les explantats excisés avec la voûte archentérique sous-jacente sont pourvus d'une chorde bien différenciée et d'un peu de tissu musculaire concentré en amas irréguliers. En revanche, le feuillet endoblastique ne manifeste aucune différenciation et prend l'aspect d'une masse vitelline parsemée de rares noyaux. Mentionnons encore que l'un de ces derniers explantats a formé quelques petits cartilages d'origine ecto-mésenchymateuse, tandis qu'un autre est pourvu d'ébauches dentaires rudimentaires. L'examen de notre tableau révèle encore que ces derniers explantats ont fourni des prestations meilleures et plus complètes que celles des explantats purement neuro-épiblastiques.



FIG. 3.

Coupe transversale d'un explantat inclus en agar.

Le manteau, c'est-à-dire la couche cellulaire de la plaque neurale, est représenté en noir; les crêtes neurales, dont la texture est plus relâchée, sont maculées de blanc. La nature fibreuse de la zone marginale de la plaque neurale est signalée par des traits. L'épiblaste, ponctué. Les petits cercles correspondent à la couche vitelline parsemée de quelques rares noyaux.

Passons maintenant en revue les différentes ébauches formées par mes explantats. Leur analyse histologique est malaisée. Les explantats, malgré leur culture de durée relativement longue, sont encore surchargés de plaquettes vitellines. Leur cytodifférenciation présente d'importantes variations individuelles. D'autre part, les diverses ébauches ont atteint des degrés différents dans leur histogenèse, laquelle peut encore varier d'un endroit à un autre dans une même ébauche. Enfin, toutes les structures constituées au sein de mes explantats sont fortement tassées. Dans ces conditions la lecture des coupes microscopiques est difficile. Par conséquent, il est préférable de les illustrer par des dessins exécutés à la chambre claire et très schématisés.

L'ébauche neurale est représentée par une plaque largement étalée (voir fig. 3). Sa cytodifférenciation est nettement retardée, mais d'une façon inégale. Des zones restreintes, situées le plus souvent au centre de la plaque neurale, sont différenciées presque normalement, tandis que dans les autres régions les cellules neuroblastiques sont encore bourrées de plaquettes vitellines et

gardent leur aspect primitif. La zone marginale, composée de substance blanche, est toujours mince et peu développée. Les crêtes neurales, très volumineuses dans la région rhombencéphalique et médullaire présomptives, se distinguent par leurs cellules relâchées, arrondies et particulièrement riches en vitellus. La migration de ces cellules est partiellement bloquée, de sorte que les crêtes neurales ne sont pas encore détachées des bords de la plaque neurale. Toutefois, ces bords forment souvent des excroissances plus ou moins saillantes et dirigées vers le bas. Les cellules les plus périphériques de la crête neurale se détachent de l'ensemble et s'insinuent entre la plaque neurale et l'épiblaste sous-jacent. Ces dernières cellules, contrairement à celles maintenues dans les crêtes neurales, ont déjà épuisé leurs réserves nutritives et se sont différenciées en éléments d'ecto-mésenchyme et, éventuellement, en quelques rares cellules pigmentaires.

L'épiblaste, séparé de la plaque cérébrale ou médullaire, par des amas de cellules de la crête neurale, est toujours épais. Dans son ensemble, il est peu différencié et surchargé de vitellus, cependant de nombreuses cellules glandulaires se sont toujours constituées, particulièrement au voisinage des bords de la plaque neurale. Cet épiblaste plus différencié ne contient plus qu'une faible quantité de plaquettes vitellines.

Entre l'épiblaste et la plaque neurale on trouve toujours une couche plus ou moins épaisse de vitellus parsemé de quelques noyaux (fig. 3). L'origine de cette couche vitelline ne m'est pas connue, peut-être s'agit-il des débris de cellules épiblastiques et neurectoblastiques endommagées involontairement au cours de la préparation de mes explantats.

Les organes des sens sont représentés par les ébauches oculaires et, quoique plus rarement, par les placodes olfactives et enfin, quand le matériel rhombencéphalique présomptif est présent, par des otocystes rudimentaires.

Ebauches optiques. Presque tous les explantats cérébraux sont pourvus d'ébauches oculaires, lesquelles se présentent différemment dans les deux sortes de mes explantats. Si la plaque neurale est prélevée sans son substratum, il ne se forme qu'une seule ébauche oculaire. Cependant, elle est partiellement dédoublée de telle sorte que le feuillet sensoriel de la rétime esquisse vaguement deux cupules optiques dont chacune contient un cristallin (fig. 4 A).

Cet œil synophtalmo-cyclope, toujours fortement aplati, est situé à l'extrémité antérieure de l'ébauche cérébrale. Les explantats de la deuxième catégorie, où la plaque neurale a été excisée avec son substratum contiennent deux yeux plus ou moins normaux (fig. 4 B).

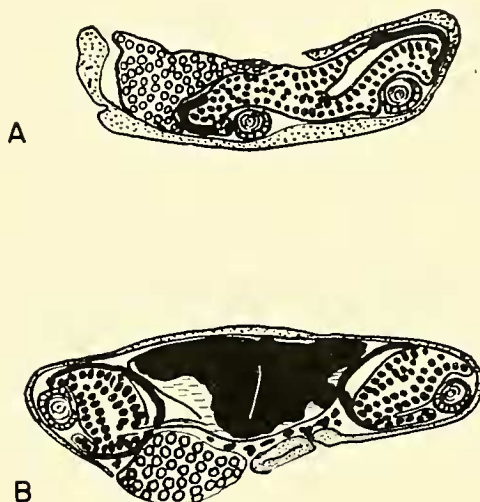


FIG. 4.

Coupes transversales de deux explantats cérébraux pratiquées au niveau de leurs ébauches oculaires.

A: explantat exclusivement neuro-épiblastique. B: explantat cérébral excisé avec la voûte archentérique sous-jacente. Les petits cercles représentent le matériel cellulaire indifférencié, à savoir le matériel neural et pédonculaire présomptif (A) et l'endoblaste pharyngien (B).

D'ailleurs le développement général de ces derniers explantats est beaucoup plus normal que celui des explantats de la catégorie précédente. Le cerveau antérieur est également formé et les placodes olfactives sont fréquemment présentes. Toutes ces ébauches sont fortement comprimées. Leurs cavités sont réduites à leur minimum et leurs contours se sont adaptés à la forme initiale de l'explantat. La voûte archentérique a pu parachever son action inductrice. Sa présence a sûrement stimulé la différenciation des ébauches. D'autre part, dans les explantats composés de plusieurs feuillettes, dont l'endoblaste pharyngien et la plaque préchordale se caractérisent par leur texture relativement lâche, un certain modelage réciproque des ébauches en voie de formation doit être possible.

La formation des ébauches oculaires synophtalmo-cyclopes aux dépens des explantats cultivés sans leur substratum mérite quelques commentaires. En effet, dans ces cas, l'enroulement de la plaque cérébrale en gouttière est complètement bloqué. Une comparaison

minutieuse des coupes sériees de mes explantats me permet de décrire schématiquement le mécanisme impliqué par cette morphogenèse atypique. Tout d'abord le bourrelet cérébral antérieur, contenant au moins la majeure partie du matériel oculaire présomptif, se replie sous la plaque cérébrale. A l'endroit occupé par le matériel destiné normalement à former des pédoncules optiques, la continuité entre l'ébauche oculaire et la plaque cérébrale se maintient. De part et d'autre de cette région, le « rebord » formé se sépare de la plaque cérébrale. Il se plisse ultérieurement pour ébaucher les cupules optiques. Ce dynamisme morphogénétique ne caractérise, d'ailleurs, que le matériel présomptif du feuillet sensoriel de la rétine. En effet, sur mes préparations ce feuillet est parfaitement différencié et ses réserves nutritives sont presque complètement épuisées. En revanche, le feuillet pigmenté de la rétine est souvent discontinu et toujours réduit quantitativement. De même la zone pédonculaire présomptive reste indifférenciée; ses cellules manifestent même une tendance à se relâcher, que l'on pourrait interpréter comme un premier signe de dégénérescence.

Les ébauches oculaires sont munies d'un seul ou de deux cristallins. (Dans un cas, pourtant, où trois cupules optiques se sont ébauchées, les trois cristallins se sont également constitués.) Les cristallins sont trop petits, mais généralement leur structure est tout à fait typique. Ils sont toujours en contact avec le bord externe et libre de la rétine où ses deux feuillets se continuent l'un dans l'autre (voir fig. 4 A). Ce fait est d'autant plus intéressant que le feuillet sensoriel de ces ébauches oculaires aplaties est appliqué étroitement et sur une longue étendue contre l'épiblaste. Il semble donc que la capacité d'induire les cristallins est limitée à la zone de la rétine qui est destinée à former l'iris.

Placodes olfactives. Dans les explantats cérébraux prélevés avec leur substratum les ébauches olfactives sont, sauf un cas exceptionnel, présentes et plus ou moins normalement développées. N'oublions pas, pourtant, que dans ces explantats la plaque acrocéphalique reposait sur un « matelas relativement mou », matelas constitué par l'endoblaste pharyngien et la plaque préchordale. Dans ces conditions, elle a pu poursuivre sa morphogenèse presque normalement et former le cerveau antérieur. De même, les placodes olfactives, en repoussant les cellules endoblastiques sus-jacentes, sont arrivées à s'invaginer. Par contre, dans les explantats exclu-

sivement neuro-épiblastiques, l'invagination de l'épiblaste est irréalisable. La placode olfactive ou bien ne se forme pas, ou bien, comme dans un cas unique, se signale par un simple épaississement d'épiblaste indifférencié. Encore dans trois autres explantats de la même catégorie, c'est-à-dire contenant des explantats composés exclusivement de la plaque cérébrale et de l'épiblaste, les placodes olfactives se sont constituées. Cependant, dans ces trois cas l'extrémité antérieure de l'explantat n'a pas été suffisamment serrée dans l'agar et une fente subsistait entre la plaque cérébrale et l'épiblaste.



FIG. 5.

Coupe transversale pratiquée au niveau des vésicules optiques. Cellules des ganglions stato-acoustiques- en noir. Les différentes zones de la plaque cérébrale, les crêtes neurales et l'épiblaste sont représentés de la même façon que sur les figures précédentes.

La formation des otocystes, constante dans les explantats cérébraux excisés avec du matériel chordo-mésoblastique, n'est que sporadique lorsque la plaque cérébrale est cultivée sans son substratum. Dans ce cas, les vésicules auditives prennent la forme d'un ellipsoïde aplati et comprimé entre l'épiblaste et la face ventrale de la plaque neurale dans laquelle il laisse une empreinte plus ou moins visible (fig. 5). Dans quelques cas, les vésicules auditives sont pourvues des ganglions stato-acoustiques. Sur certaines de mes coupes, on aperçoit même des futures cellules ganglionnaires en train de se détacher de la paroi d'un otocyste.

Je ne possède pas dans mon matériel de stades successifs de la formation des vésicules auditives, il est cependant évident que leur évolution n'a pas pu suivre sa voie normale. La paroi des otocystes est dès le début relativement mince et, par conséquent, l'invagination des placodes auditives d'un explantat comprimé dans l'agar me semble exclue, la pression d'une petite quantité de liquide contenu entre la plaque neurale et cette placode aurait empêché son invagination. Dans ces conditions je ne vois qu'une seule interprétation possible. C'est au sein même de la placode auditive que se creuse une petite cavité virtuelle laquelle augmente de

volume grâce à la sécrétion de l'endolymphe par les cellules qui l'entourent. Cette dilatation progressive de la vésicule otique doit être ou bien précédée ou bien suivie d'un clivage qui la détache de l'épiblaste dans lequel elle a pris naissance. En tout cas, la forme d'un ellipsoïde aplati que prennent les otocystes dans mes explantats et les empreintes qu'ils laissent dans la plaque neurale sus-jacente montrent bien qu'ils se comportent comme des ballons élastiques et comprimés.



FIG. 6.

Coupe d'un explantat cérébral prélevé avec son substratum inducteur et recouvert d'épiblaste.

Cellules mésenchymateuses: en noir; amas musculaires: quadrillés.

Examinons maintenant le développement de la voûte archentérique dans les cas où la plaque neurale a été excisée avec son substratum.

L'ébauche chordale se différencie toujours parfaitement, cependant, son extension étant inhibée, son diamètre est trop grand (fig. 6).

Le mésoblaste parachordal se transforme, au moins partiellement, en amas de fibres musculaires bien différenciées (fig. 6). Ces masses musculaires sont toujours situées au voisinage immédiat de la chorde, cependant elles peuvent se continuer latéralement dans le mésoblaste encore surchargé de vitellus et non différencié.

La morphogenèse et l'histogenèse du feuillet endoblastique sont complètement bloquées. Même sur les coupes de mes explantats les plus âgés, l'endoblaste se présente toujours sous la forme de masses compactes composées de cellules bourrées de vitellus.

SYNTHÈSE ET DISCUSSION DES RÉSULTATS

L'inclusion des explantats neuraux dans de petits blocs d'agar empêche leur croissance et les modifications ultérieures de leur forme initiale. Cependant, des processus morphogénétiques d'une

moindre envergure peuvent encore se réaliser. Le bord antérieur de la plaque cérébrale s'enroule presque toujours et donne naissance aux ébauches oculaires plus ou moins déformées, lesquelles induisent la formation de cristallins dans l'épiblaste sous-jacent. En effet, même si la plaque neurale est découpée tout près de ses bourrelets, la mince bordure épiblastique est capable, grâce à ses tendances épiboliques, de revêtir, au moins partiellement, la face ventrale de l'explantat.

Les vésicules otiques, dont j'ai signalé le mode insolite de formation, sont présentes dans la plupart de mes explantats contenant le matériel rhombencéphalique présomptif. En revanche, la formation des fossettes olfactives est beaucoup plus rate. Les possibilités morphogénétiques de mes explantats dépendent largement de leur composition. Ce ne sont que les explantats prélevés avec leur substratum inducteur qui arrivent à construire un rudiment du cerveau antérieur et des organes des sens relativement bien conformés. N'oublions pas pourtant que dans les explantats doués d'une capacité formatrice moindre, la plaque neurale a été soustraite précocement à l'action inductrice de son substratum. D'autre part, un certain modelage de ces derniers explantats, dont les deux feuilletts sont appliqués étroitement l'un contre l'autre et serrés ensemble dans l'agar, doit être plus difficile à réaliser que dans les cas où la plaque neurale et l'épiblaste sont séparés par la voûte archentérique d'une texture relativement lâche.

Un fait doit encore retenir notre attention, dans les deux catégories de mes explantats le bord postérieur de la plaque cérébrale excisée, contrairement à son bourrelet antérieur, ne s'enroule et ne se plisse jamais. Le dynamisme morphogénétique de la région antérieure de la plaque cérébrale, et surtout de son territoire oculaire présomptif, est donc sûrement particulièrement grand.

Le blocage partiel, ou même parfois complet, des processus morphogénétiques n'interrompt pas nécessairement le déroulement normal de la cytodifférenciation de mes explantats. Toutefois, les rapports entre ces deux processus ne sont pas les mêmes pour toutes les ébauches. Dans mes explantats, l'ébauche chordale, dont la capacité d'évolution autonome est connue de longue date, est toujours parfaitement différenciée, bien que son extension caractéristique soit complètement bloquée. Au contraire, le feuillet endoblastique se révèle entièrement inapte à poursuivre aussi bien

sa morphogenèse que sa différenciation propre. L'histogenèse de l'ébauche neurale, maintenue par l'agar à l'état d'une plaque largement étalée, se poursuit pourtant normalement, tout au plus elle est un peu retardée par rapport à la différenciation des explantats de contrôle correspondants. De ce point de vue, la crête neurale se distingue nettement de l'ébauche cérébrale proprement dite. La majeure partie des cellules de la crête neurale restent bloquées en leur lieu d'origine, c'est-à-dire le long des bords latéraux de la plaque cérébrale. Seules les cellules les plus périphériques, qui parviennent à s'insinuer entre la plaque neurale et l'épiblaste, et qui ont pu réaliser leur tendance migratrice, se transforment en éléments ecto-mésenchymateux et pigmentaires.

Les fossettes olfactives, les cristallins et les vésicules auditives proviennent d'une action inductrice secondaire produite par le cerveau déjà constitué. Il faut que ces ébauches sensorielles puissent prendre au moins une forme presque normale, pour que leur cytodifférenciation s'amorce. Par contre, si leur morphogenèse est rendue impossible, on n'assiste à aucune différenciation.

De ce succinct aperçu synthétique se dégage déjà une interprétation simple et cohérente. Les ébauches pourvues dès le début d'une grande capacité d'évolution autonome, comme la chorde par exemple, poursuivent leur cytodifférenciation normale même si la réalisation de leurs tendances morphogénétiques intrinsèques est empêchée mécaniquement. L'histogenèse de l'ébauche cérébrale, dont la formation est due à l'induction, dite primaire, n'est encore que très faiblement influencée par l'arrêt de sa morphogenèse. Par contre, une interdépendance étroite entre les processus morphogénétiques et histogénétiques caractérise le développement des placodes olfactives, cristalliniennes et auditives, c'est-à-dire des ébauches issues d'une action inductrice secondaire et tardive. On serait presque tenté de dire que la cytodifférenciation d'une ébauche est d'autant plus indépendante de sa morphogenèse qu'elle apparaît plus tôt au cours du développement embryonnaire. A considérer la différenciation des divers composants de l'ébauche oculaire dans mes explantats sans substratum, et par conséquent sous-induits, on constate qu'il faut apporter quelques nuances à cette supposition. Si l'histogenèse du feuillet sensoriel de la rétine est même plus avancée que celle de la plaque cérébrale et si son dynamisme morphogénétique est tellement actif que ce feuillet parvient

malgré tous les obstacles à ébaucher une cupule optique rudimentaire, le feuillet pigmenté, pour sa part, reste en général déficient quantitativement et qualitativement. Le matériel pédonculaire présomptif, enfin, est toujours plus ou moins indifférencié. On pourrait croire que cet arrêt de sa différenciation est imputable à l'inhibition partielle de la morphogenèse de l'ébauche oculaire. Toutefois, il est bien connu, et je l'ai observé, moi-même, à maintes reprises au cours de mes expériences précédentes, que l'ébauche cérébrale sous-induite forme une vésicule optique qui se détache souvent du cerveau (SATO et EGUCHI, 1960). Dans de tels cas, le pédoncule optique ne s'est pas formé sans que le déroulement des processus morphogénétiques ait été gêné. Ce fait montre de nouveau que le matériel pédonculaire présomptif est le dernier à acquérir sa capacité d'auto-différenciation.

RÉSUMÉ

1. Les explantats cérébraux de trois sortes (plaque cérébrale entière, sa région antérieure et postérieure) sont prélevés sur de jeunes neurulas de *Triturus alpestris* avec ou sans leur substratum inducteur. Dans la plupart des expériences, leur face ventrale est recouverte d'un lambeau d'épiblaste. Ces explantats sont inclus dans de petits blocs d'agar et cultivés de dix à treize jours dans la solution de Holtfreter.

2. Pendant toute leur culture les explantats gardent leur forme et leurs dimensions initiales. Cependant, les processus morphogénétiques d'une moindre envergure peuvent encore se poursuivre et aboutir à la formation de cupules optiques rudimentaires, de fossettes olfactives et de vésicules optiques. Si les explantats cérébraux sont excisés avec la voûte archentérique sous-jacente, cette dernière se différencie en chorde parfaitement constituée et en amas de tissu musculaire. En revanche, le feuillet endoblastique est incapable d'accomplir aussi bien sa morphogenèse que sa différenciation propre.

3. La plaque cérébrale comprimée dans l'agar ne peut pas se transformer en gouttière et en tube neural. Néanmoins, sa différenciation histologique, bien qu'un peu retardée, se poursuit normalement.

4. Le feuillet sensoriel de la rétine parvient toujours à ébaucher une cupule optique au moins rudimentaire, souvent par des voies évolutives insolites. D'autre part, son histogenèse est toujours la plus complète.

5. La capacité d'induire le cristallin est limitée au bord libre de la rétine, lequel correspond au futur iris.

6. Les cellules de la crête neurale sont bloquées en leur lieu d'origine, le long des bords latéraux de la plaque cérébrale. Seules, les rares cellules qui ont pu s'échapper et s'insinuer entre la plaque neurale et l'épiblaste peuvent encore se différencier en éléments ecto-mésenchymateux et pigmentaires.

7. L'arrêt de la morphogenèse ne compromet pas gravement les possibilités histogénétiques propres à l'ébauche chordale et à la plaque cérébrale. En revanche, l'histogenèse des placodes sensorielles (olfactives, cristaliniennes et otiques) ne se réalise pas en absence de morphogenèse.

ZUSAMMENFASSUNG

Drei Arten von Gehirnexplantaten, nämlich die vollständige Gehirnplatte, ihre vordere und ihre hintere Partie, werden jungen Neurulas von *Triturus alpestris* entnommen, in kleine Agar-Blocks eingeschlossen und ca. zwei Wochen in Holtfreterscher Lösung gezüchtet.

Diese Explantate behalten ihre ursprüngliche Form und ihre ursprünglichen Dimensionen bei. Hingegen setzt sich die Histogenese fort, und morphogenetische Vorgänge geringeren Ausmasses führen zur Bildung von rudimentären Augenbechern und Otcysten.

Die meisten Zellen der Neuralleiste bleiben am Ort ihrer Entstehung, die wenigen Zellen, welche zwischen die Neuralplatte und das Epiblast gelangten, entwickeln sich zu Ektomesoderm und pigmentären Elementen.

Das Aufhören der Morphogenese beeinflusst die histogenetischen Möglichkeiten der Gehirnplatte und der Chorda-Anlage nicht. Dagegen gibt es keine Histogenese der sensorischen Placoden (Riechplacoden, Linsenplatten, Hörplatten) ohne Morphogenese.

SUMMARY

Three kinds of cerebral tissue explants, such as the whole brain plate, its anterior part, and its posterior part, were taken from young neurulas of *Triturus alpestris*, were included in small blocks of agar and were cultivated for about two weeks in Holtfreter's solution.

These explants maintained their primitive shape and dimensions. However, histogenesis continued and morphogenetic processes of lesser importance resulted in the constitution of rudimentary optic cupulas and otocysts.

Most of the cells of the neural crest remained in their original position, the few cells that were able to migrate between the neural plate and the epiblast differentiated into ecto-mesenchymatic and pigmentary elements.

Halting of morphogenesis did not compromise the histogenetic possibilities of the brain plate and the notochordal bud. On the other hand, the histogenesis of sensorial placodes (olfactive placode, lens and otic placode) is not realized without morphogenesis.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- DALCQ, A. et R. LALLIER. 1948. *Transplantations de territoires variés de la zone marginale médio-dorsale de la jeune gastrula chez le Triton*. Arch. Biol. 59: 267-378.
- GALLERA, J. 1955. *Embryologie du système nerveux central, et différenciation histologique des explantats et des transplantats cérébraux chez l'Urodèle, Pleurodeles Waltlii*. Arch. Suisses Neur. et Psychiatrie 75: 22-46.
- HOESSELS, E. L. M. J. 1957. *Evolution de la plaque préchordale d'Amblystoma mexicanum; sa différenciation propre et sa puissance inductrice pendant la gastrulation*. Edit. J. Stegen, Maastricht.
- HOLTFRETER, J. 1945. *Differential inhibition of growth and differentiation by mechanical and chemical means*. Anat. Record 93: 59-74.
- JACOBSON, C. O. 1959. *The localization of the presumptive cerebral regions in the neural plate of the Axolotl larva*. J. Embryol. exp. Morph. 7: 1-21.
- NIU, M. C. and V. C. TWITTY. 1953. *The differentiation of gastrula ectoderm in medium conditioned by axial mesoderm*. Proc. national Acad. Sc. U.S.A. 39: 985-989.

- SATO, G. und G. EGUCHI. 1960. *Ueber Linsenregeneration bei Zyklopenlarven von Triturus pyrrhogaster*. Roux Arch. Entw. Mech. 152: 373-397.
- TAKAYA, H. 1953. *On the loss of the notochordal-forming potency in the prechordal plate of the Triturus gastrula*. Annot. zool. jap. 26: 202-207.
- 1959. *Regional specificities in the differentiating neuralplate ectoderm of Amphibian embryos*. Jap. J. Zool. 12: 345-359.
- TÖNDURY, G. 1948. *Beiträge zum Problem der Regulation und Induktion in der Primitiventwicklung*. Acta Anatomica 4: 317-392.
- WOELLWARTH, C. 1952. *Die Induktionsstufen des Gehirns*. Roux Arch. Entw. Mech. 145: 582-668.
-